

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Кузнецової Галини Миколаївни «Вплив неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на вісь запалення-фіброз-канцерогенез (на прикладі органів травлення)», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Проблема розробки максимально дієвих та безпечних протипухлинних засобів була і залишається однією з найважливіших у сучасній медицині. Однією з перешкод, що стоїть на шляху до її успішного вирішення, є недостатньо повне розуміння процесів, що призводять до злоякісного переродження, у зв'язку з чим важко визначити ту оптимальну часову точку, коли пухлина вже утворилася, і специфічна протипухлинна терапія стає необхідною. Відомо, що злоякісне переродження клітин потребує певних умов, тобто існують патологічні стани, визнані передраковими. Вивчення цих передумов, пошук спільних ланок у механізмах патологічних процесів, що можуть призвести до злоякісного переродження є надзвичайно актуальним завданням.

Розвиток злоякісного переродження на тлі хронічного запалення є явищем досить поширеним, отже останнє може вважатися передраковим станом. Ще одним, більш специфічним передраковим станом є фіброз печінки. Тому припущення щодо причинно-наслідкового зв'язку між цими станами заслуговує на особливу увагу. Рецептори ростових факторів з тирозинкіназною активністю відіграють надзвичайно важливу роль у пухлинному рості, зокрема, пухлинах епітеліального походження, і є визнаною мішенню протипухлинної терапії. Дослідження останніх років продемонстрували також, що сигнальні шляхи цих рецепторів мають багато спільних ланок із прозапальними та профіброзними сигнальними шляхами, хоча питання щодо розробки протизапальних та протифіброзних засобів на

основі інгібіторів зазначених рецепторів залишається відкритим. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Кузнецової Г.М., присвячена обґрунтуванню можливості і доцільності впливу неспецифічними інгібіторами рецепторів ростових факторів (похідні піролу та не модифіковані C60 фулерени) на процеси запалення, фіброзу і канцерогенезу товстої кишки та печінки, як послідовні ланки одного патологічного процесу, є актуальною і практично значимою.

Дисертаційна робота має традиційну структуру та складається із вступу, 9 розділів (огляд літератури; матеріали і методи досліджень; 6 розділів власних експериментальних досліджень; аналіз та обговорення), узагальнення, висновків та списку посилань. Текст дисертаційної роботи викладено на 324 сторінках машинописного тексту, він містить 59 рисунків і 33 таблиці. Список посилань налічує 345 джерел.

У розділі «Огляд літератури» представлено сучасні уявлення про основні патогенетичні механізми розвитку хронічного запалення, фіброзного переродження та раку товстої кишки та печінки. Розглянуто причинно-наслідкові зв'язки між хронічним запаленням та фіброзом і злоякісною трансформацією на прикладі патологій товстої кишки та печінки. Проаналізовано сучасні результати досліджень, присвячених ролі ростових факторів та їх рецепторів у патогенезі хронічного запалення, фіброзу та злоякісного переродження товстої кишки та печінки. Детально висвітлено сучасні досягнення у терапії захворювань, пов'язаних із зазначеними патологічними станами. Приділено увагу основним принципам, напрямкам та можливостям корекції захворювань товстої кишки та печінки, пов'язаних із їх запаленням, фіброзом та раком, через вплив на сигнальні шляхи, пов'язані з ростовими факторами.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» надано характеристику похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (M1-1) і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату (C60-M1-3OH) та

немодифікованих C60 фулеренів – сполук, використаних як неспецифічні інгібітори рецепторів ростових факторів; наведено використані методи *in silico* та *in vitro*, описано *in vivo* моделі гострого та хронічного запалення і раку товстої кишки та печінки, фіброзу та цирозу печінки; наведено методології оцінки морфо-функціонального стану товстої кишки та печінки за модельованих патологічних станів.

Потрібно відмітити велику кількість та широкий діапазон методів, які Кузнєцова Г.М. використовувала в роботі (їх викладення зайняло майже 25 стор.), а також велику кількість показників, що аналізувались.

У розділі «Місцеві та системні ефекти похідних піролу та C60 фулеренів за гострого запалення кишечника та печінки» представлено результати досліджень локальних і системних змін в організмі лабораторних тварин за моделювання гострого гепатиту, гострого коліту та дії похідних піролу та C60 фулеренів на їх тлі. Показана здатність досліджених сполук зменшувати ураження цільових органів і сприяти частковому наближенню до норми значень гематологічних показників та сироваткових маркерів стану печінки й нирок, що свідчить про місцеву та системну протизапальну дію цих сполук.

У розділі «Місцеві та системні ефекти похідних піролу та C60 за хронізації запального процесу» на підставі аналізу морфо-функціонального стану цільових органів показано здатність похідного піролу MI-1 та C60 фулеренів пригнічувати хронічне запалення товстої кишки та печінки, при цьому захисні ефекти обох сполук за запалення як товстої кишки, так і печінки, були більш вираженими за хронічного впливу порівняно з гострим, що узгоджується з гіпотезою автора про реалізацію протизапальної активності сполук через інгібування проліферативних сигнальних шляхів, роль яких за хронічного запалення, порівняно з гострим, стає вельми суттєвою.

У розділі «Вплив сполук на початкові стадії фіброзного переродження» наведено дані автора щодо здатності похідних піролу та C60 фулеренів

зменшувати накопичення сполучної тканини в печінці за моделювання гострого та хронічного ураження жовчних проток, що супроводжується їх фіброзним переродженням, а також інші місцеві й системні прояви, що його супроводжують.

У розділі «Вплив C60FAS на розвиток фіброзу та цирозу печінки різної етіології» представлено результати аналізу морфо-функціонального стану печінки лабораторних тварин за моделювання її фіброзу і цирозу гепатоцелюлярного та біліарного походження, на підставі якого зроблено заключення про здатність C60 фулеренів пригнічувати розвиток фіброзу та цирозу печінки гепатоцелюлярного походження.

У розділі «Ефекти похідних піролу та C60FAS за злоякісного переродження органів травлення» проаналізовано місцевий та системний вплив похідних піролу та C60 фулеренів на цільові органи (товсту кишку та печінку) щурів за моделювання їх злоякісного переродження, що відповідає колоректальному раку, гепатоцелюлярній карциномі та холангіокарциномі. Показано здатність досліджених сполук пригнічувати розвиток пухлин печінки та товстої кишки та/або запобігати формуванню нових, а також сприяти частковому зменшенню негативних системних проявів раку.

У розділі «Механізми реалізації біологічної активності похідних піролу та C60FAS» узагальнено результати досліджень автора з встановлення основних механізмів реалізації біологічної дії похідних піролу та C60 фулеренів, а саме, окрім здатності зв'язуватися з АТФ-зв'язуючим центром рецепторів ростових факторів EGFR, VEGFR та FGFR, показана здатність MI-1 та C60 пригнічувати проліферацію окремих клітинних ліній та стимулювати їх апоптоз; сприяти відновленню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги цільових органів за їх запалення, фіброзу, цирозу та раку; впливати на експресію білків цитокератинів і віментину та p53.

У розділі «Аналіз та обговорення: роль інгібування рецепторів ростових факторів у прогресії запалення – фіброз – канцерогенез на прикладі патологій органів травлення» на основі даних літератури та результатів

власних досліджень проаналізовано можливість і доцільність інгібування рецепторів ростових факторів для пригнічення запалення, фіброзу та канцерогенезу товстої кишки та печінки, а також актуальність розробки лікарських засобів таргетної дії на основі інгібіторів зазначених рецепторів.

У розділі «Узагальнення результатів досліджень» стисло і чітко підсумовано результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконувалась у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка за 4-ма темами науково-дослідних робіт упродовж 2012-2021 років, а саме: «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ ДР 0111U004648, 2011-2015 рр.); «Похідні піролу як протизапальні та протипухлинні сполуки нового покоління (№ ДР 0116U002639, 2016-2017 рр.); «Біосумісні водорозчинні C60 фулерени як протифіброзні та антинеопластичні засоби при злоякісних новоутвореннях печінки» (№ ДР 0118U000244, 2018-2020 рр.); «Новітні гібридні антипухлинні та протизапальні наноконплекси на основі піролів і C60 фулерену: створення, характеризування, фармакодинаміка і токсикологічна характеристика» (№ ДР 0119U100331, 2019-2021 рр.).

Новизна дослідження та одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням, у якому автором встановлено здатність похідних піролу 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (МІ-1) і 3-{[4-хлор-1-(4-хлоробензил)-2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-3-іл]аміно}феніл 4-[6,6]-феніл-C61-бутаноату (C60-МІ-3ОН) та немодифікованих C60 фулеренів (C60FAS) пригнічувати гостре та хронічне запалення товстої кишки і печінки щурів, фіброз печінки (для всіх сполук) та її цироз гепатоцелюлярного та біліарного походження (для C60FAS), пригнічувати розвиток колоректальних пухлин (для всіх сполук), гепатоцелюлярної карциноми та холангіокарциноми (для C60FAS),

подовжувати термін життя тварин за раку печінки, а також сприяти поліпшенню загального стану щурів за модельованих патологій. Автором показано, що механізми дії досліджених сполук, окрім здатності утворювати стабільні зв'язки з АТФ-зв'язуючим центром тирозинкіназ EGFR, VEGFR та FGFR, включають антипроліферативну, проапоптичну активність (зокрема, щодо клітин гепатоцелюлярного походження HepG2), здатність впливати на експресію низки білків, залучених у проліферацію, диференціацію та апоптоз клітин (p53, EGFR, пан-цитокератинів та віментину) (для C60FAS), виявляти антиоксидантні властивості.

На підставі аналізу власних результатів та даних літератури автором обґрунтовано можливість і доцільність застосування мультикіназних інгібіторів рецепторів ростових факторів не тільки як протизапальних та протифіброзних сполук, а як потенційних засобів впливу на хронічне запалення, фіброз і канцерогенез як послідовні ланки одного патологічного процесу.

Практичне значення отриманих результатів полягає в отриманні даних щодо протизапальної, протифіброзної та протипухлинної активності C60 фулеренів та MI-1, що можуть бути обґрунтуванням можливості створення на їх основі препаратів з цільовою протизапальною чи протифіброзною активністю, або ж комплексної дії, що можуть застосовуватися за раку товстої кишки і/чи печінки та їх передракових станів. Крім того, отримані результати можуть бути основою розробки принципово нового підходу до застосування мультикіназних інгібіторів як універсальних засобів впливу на вісь «хронічне запалення – фіброз – канцерогенез» як один патологічний процес.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертантка проаналізувала велику кількість літературних джерел, присвячених проблематиці дослідження, при цьому залучення значної частини наукових джерел останніх років дало змогу на високому рівні обґрунтувати вибір теми

наукової роботи та методичних підходів для виконання поставлених завдань. Всі експериментальні результати одержані автором з використанням сучасних та апробованих методів дослідження, адекватних поставленим задачам дослідження. Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великої кількості фактичного матеріалу, а достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. З огляду на це, вважаю, що наукові положення дисертації та її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації висвітлені у публікаціях та наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 29 статей у провідних фахових виданнях України та іноземних, з яких 15 – у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази SCOPUS; 1 розділ монографії; 5 патентів на винаходи та корисну модель; 32 тези доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференцій і з'їздів. Потрібно відмітити якість публікацій, значна частина яких надрукована в авторитетних журналах, що належать до Q1 та Q2, а також 5 патентів на винахід та корисну модель.

Матеріал дисертації в цілому логічно оформлено, викладено науковою мовою, доцільно підкріплено ілюстративними засобами. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

Робота хорошо ілюстрована, добре вичитана і написана гарною українською мовою.

Проте, незважаючи на високий науковий рівень проведених досліджень, робота містить і деякі недоліки та неточності:

Трапляються помилки, навіть у списку власних публікацій, неточності (аннексин V - не барвник), надлишок емоцій («разючий»), жаргон («запускають» її фіброз), невдалі вирази («мутації-водії»). Бажано також розшифровувати скорочення при першому згадуванні в тексті.

C60 було використано як носій, який потенційно може зменшити токсичність MI-1 та потенціювати його біологічні ефекти. З рис. 5.2. видно, що ушкодження печінки щурів, що зазнали дії C60-MI-3OH у конц. 5,0 мг/кг практично не відрізняються від дії α -нафтилізотіоціанату (ANIT). Схоже на те, що цю комбінацію можна рекомендувати не для лікування, а для індукції фіброзу. В роботі цей факт не обговорюється.

Не менше 30% посилань на роботи, опубліковані понад 10 років тому, а іноді і з минулого століття. Одне з посилань датоване 1098 роком. І це не тільки методичні роботи, але й огляди, що небажано.

Крім того, виникли деякі дискусійні запитання.

1. За кривими виживання, за дії 5ФУ та C60FAS на тлі холангіокарциноми (рис. 7.8) видно, що C60FAS через 6 тижнів знижує виживаність тварин, а через 22 тижні дещо підвищує. Як це можна пояснити?

2. Чому ви не використовували клітини карцином печінки та раку ШКТ?

3. Є дані, що великі молекули канцеростатиків (інтеркалюючі агенти, антимітотики) погано проникають в пухлину - десь на 20% її об'єму від поверхні. Розмір C60 фулеренів близько до діаметра α -спіралі поліпептидів (0,714 нм). Чи є у Вас, або в літературі дані щодо проникнення їх в тканини?

4. Ви досліджували ефекти сполук MI-1 і C60 за розвитку гострого коліту. З чим Ви можете пов'язати низьку антиколітну ефективність MI-1 за ректального застосування, на відміну від C60, який має найбільшу саме за ректального застосування. Адже Ви здійснювали аплікацію досліджуваних сполук саме на зону ураження. І чому Ви не досліджували дію комплексної сполуки C60-MI-1-OH після ректального застосування?

5. Результатами Ваших досліджень ви продемонстрували терапевтичний відновлюючий вплив сполук MI-1 і C60 за хронічного коліту. З чим Ви можете пов'язати відсутність посилення ефективності за сумісного впливу C60 і MI-1 порівняно з ефектами MI-1?

6. Два препарати розчиняли в ДМСО, один – без. Що ви вводили контрольним тваринам?

7. Було встановлено, що С60FAS дозозалежно пригнічує експресію EGFR та цитокератинів, проте стимулює експресію віментину, який використовується як онкомаркер саркоми та коло ректального раку. Чи не може це свідчити про побічні ефекти?

8. Яка роль макрофагів у хронічному запаленні кишечника та печінки і потім у формуванні пухлини?

9. Каскад РІЗК може бути причиною і сприяє канцерогенезу і іншим патологіям. Які саме зміни у активності компонентів цього сигнального шляху призводять до виникнення захворювань печінки та ШКТ?

В цілому вказані недоліки не знижують загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів біології і медицини, що стосуються встановленню патогенетичних механізмів розвитку поширених захворювань та розробки нових підходів до їх лікування. Результати роботи Кузнецової Галини Миколаївни можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках а також при викладанні навчальних курсів з цитології, клітинної біології, біомедицини та ін.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора біологічних наук. Вважаю, що за обсягом зібраного матеріалу, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень рецензована дисертація «Вплив неспецифічних інгібіторів рецепторів ростових факторів на вісь запалення-фіброз-канцерогенез (на прикладі органів травлення)» є завершеною науковою роботою, яка цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Кузнецова Галина

Миколаївна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент,
гол. наук. співроб. відділу
фундаментальних та прикладних
проблем ендокринології
ДУ «Інститут ендокринології та
обміну речовин ім. В.П. Комісаренка
НАМН України»
доктор біологічних наук,
ст. наук. співроб.

В. М. Пушкарьов

